



УДК 577.217

ТРЕТИЙ САЙТ 70S РИБОСОМЫ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ АНАЛОГА АМИНОАЦИЛ-тРНК

Д. Б. Дорохов, С. Б. Бурд, Ю. П. Семенов

В последнее время уделяется большое внимание изучению взаимодействия тРНК с рибосомой — одного из ключевых этапов биосинтеза белка. В процессе биосинтеза белка тРНК взаимодействует с рибосомой в трех формах: аминоксил-тРНК, пептидил-тРНК и деацилированная тРНК. Аминоксил-тРНК, как известно, является весьма лабильной молекулой. Довольно быстрое деацилирование при физиологических условиях эксперимента и практически мгновенное образование дипептидов при взаимодействии с рибосомой делают природную аминоксил-тРНК (aa-тРНК) крайне сложным объектом в изучении ее взаимодействия с рибосомой. Для преодоления этих трудностей при изучении количественного взаимодействия aa-тРНК с 70S рибосомой в настоящей работе мы вместе с природной aa-тРНК использовали ее «амидный» аналог — тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe. В этой модифицированной тРНК аминокислотный остаток присоединен к 3'-концевому аденозину в 3'-положении рибозы «прочной» амидной связью, которая устойчива к гидролизу в физиологических условиях и препятствует миграции аминокислотного остатка в 2'-положение [1, 2].

Одним из основных достоинств тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe как аналога природной aa-тРНК является то, что она не способна функционировать на рибосоме в качестве донора пептида, хотя и акцептирует его. Поэтому при связывании аналога с вакантными А- и Р-сайтами рибосомы не происходит реакции транспептидации. Таким образом, «амидный» аналог aa-тРНК представляет интересной моделью для исследования термодинамических параметров взаимодействия aa-тРНК с рибосомой.

В работе использовали 30S и 50S субчастицы 70S рибосом *Escherichia coli*, полученные в соответствии с [3], и фракционированную поли(U) со средней молекулярной массой 30 000 [4]. Препарат тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-[¹⁴C]Phe был синтезирован по [5] и обогащен до 1400 пмоль/ед. A₂₆₀ так же, как это описано для Phe-тРНК^{Phe} [6]. Удельная активность [¹⁴C]фенилаланина составляла 800 расп./мин·пмоль.

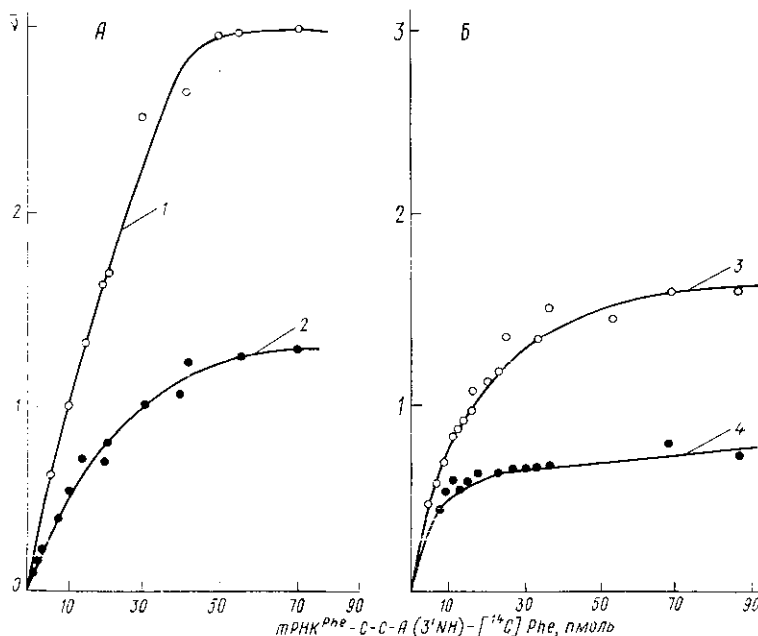
Эксперименты проводили при 0 °С в стандартном буферном растворе: 0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,02 М MgCl₂, 0,2 М NH₄Cl, 0,001 М ЭДТА. 70S рибосомы получали реассоциацией 30S и 50S субчастиц в указанном буфере в молярном соотношении 1:1,2 соответственно, предварительно реактивировав их в стандартном буфере 60 мин при 37 °С [7]. Значение \bar{v} (среднее количество молекул тРНК, связанное с молекулой рибосомы) определяли методом фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры (Suprog № 6, ЧССР). Антибиотики тетрациклин («Serva», ФРГ) и эденин («Calbiochem», США) применяли при их конечной концентрации 10⁻⁴ и 10⁻⁵ М соответственно. Фоновое связывание тРНК на фильтрах (реакционная смесь без рибосом) в каждом эксперименте определяли и вычитали.

На рисунке, А показан результат титрования 70S рибосом тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe в присутствии поли(U). Из кривой 1 следует, что 70S·поли(U)-комплекс связывает три молекулы этого аналога аминоксил-тРНК. В присутствии эденина и тетрациклина мы наблюдаем связывание только одной молекулы (кривая 2). В отсутствие поли(U) 70S рибосомы связывают две молекулы «амидной» Phe-тРНК^{Phe} (рисунок, Б, кривая 3) и эденин блокирует связывание одной из них (кривая 4). Поскольку эденин и тетрациклин являются специфическими ингибиторами связывания тРНК соответственно с Р- и А-сайтами 70S рибосом, результаты экспериментов на рисунке можно интерпретировать следующим образом: в присутствии поли(U) аналог Phe-тРНК^{Phe} связыва-

ется с Р-, А- и неким «дополнительным» сайтом 70S рибосом; без матричной РНК, когда взаимодействие тРНК с А-сайтом не наблюдается, этот аналог связывается с Р- и, очевидно, с тем же «дополнительным» третьим сайтом.

В настоящее время известно, что помимо Р- и А-сайтов 70S рибосомы содержат третий, Е- или «exit»-сайт [8—10]. Из трех биологических форм тРНК, принимающих участие в каждом цикле элонгации, две из них — аминоацил- и пептидил-тРНК — могут взаимодействовать только с Р- и А-сайтами вакантных 70S рибосом, тогда как деацилированная тРНК связывается со всеми тремя сайтами.

Наблюдаемый нами «дополнительный» сайт для тРНК^{Phe}-С—А(3'NH)-Phe логично идентифицировать с Е-сайтом, так как тетрациклин и эдеин не блокируют его и



Изотермы адсорбции тРНК^{Phe}-С—А(3'NH)-[¹⁴C]Phe: А — на комплексе 70S·поли(У) в отсутствие антибиотиков (1) и в присутствии тетрациклина и эдеина (2); Б — на 70S рибосомах без поли(У) в отсутствие (3) и в присутствии (4) эдеина. Инкубационные смеси объемом 0,1 мл содержали 10 пмоль 70S и 5 мкг поли(У), если это указано. Время инкубации 3 ч.

(А) The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe to the 70S poly(U) complex in the absence of antibiotics (curve 1) and in the presence of tetracycline + edeine (curve 2); (Б) The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe to 70S ribosomes without poly(U) in the absence of (curve 3) and in the presence of (curve 4) edeine. Each incubated mixture (0.1 ml) contained 10 pmol 70 S ribosomes and 5 μg poly(U). The incubation time — 3 h.

он матричнонезависим, что характерно для взаимодействия деацилированной тРНК^{Phe} с Е-сайтом [10]. Далее нужно отметить, что специфичность Е-сайта по отношению к деацилированной тРНК^{Phe} не является абсолютной, так как Граевская и соавт. [9], используя метод равновесной седиментации, наблюдали слабую, но заметную конкуренцию немодифицированной Phe-тРНК^{Phe} с тРНК^{Phe} за Е-сайт. Резкое увеличение сродства тРНК^{Phe}-С—А(3'NH)-Phe к Е-сайту по сравнению с Phe-тРНК^{Phe} можно, по-видимому, объяснить различием в их конформации. Об этом, в частности, свидетельствуют результаты Понгса и соавт. [11], где замена 3'-гидроксила на аминогруппу в 3'-концевой рибозе тРНК^{Phe} приводила к значительному изменению структуры этой тРНК.

Если это предположение верно, то можно сделать следующие выводы из результатов данной работы.

1. Получено дополнительное доказательство существования третьего, Е-сайта, в 70S рибосомах.

2. «Узнавание» этого сайта обусловлено не столько отсутствием аминокислотного (или пептидильного) остатка на 3'-конце молекулы тРНК, сколько ее конформационным состоянием

THE THIRD SITE OF THE 70S RIBOSOME FOR AMINOACYL-tRNA ANALOGUE BINDING

D. B. Dorokhov, S. B. Bourd, Yu. P. Semenov

Department of Plant Genetics, Academy of Sciences
of the Moldavian SSR, Kishinev;
B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina

Summary

The interaction of the stable aminoacyl-tRNA analogue, tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-Phe, with 70S ribosome is studied. It is shown that in the presence of poly(U) a ribosome can bind three molecules of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-Phe. The «additional» site for binding aminoacyl-tRNA analogue was shown to be similar to the ribosomal E-site for deacylate tRNA.

1. *Fraser T. H., Rich A.* Synthesis and aminoacylation of 3'-deoxytransfer RNA and its activity in ribosomal protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1973.—**70**, N 9.—P. 2671—2675.
2. *Sprinzi M., Wagner T.* Role of 2', 3' isomerization of aminoacyl-tRNA during ribosomal protein synthesis // Transfer RNA: structure, properties and recognition.—New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.—P. 12.
3. *Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P.* Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Direct functional evidence that isolated 30S subunits contain two codon-specific binding sites for transfer RNA // Nucl. Acids Res.—1980.—**8**, N 1.—P. 183—196.
4. *Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of Escherichia coli* // V. I. Katunin, Yu. P. Semcnkov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // Ibid.—1980.—**8**, N 2.—P. 403—421.
5. *Sprinzi M., Sternbach H.* Enzymatic modification of the C-C-A terminus // Meth. Enzymol.—1979.—**59**—P. 182—190.
6. *Rappaport H., Lapidot Y.* The chemical preparation of acetylaminoacyl-tRNA // Ibid.—1974.—**29 E.**—P. 685—693.
7. *Пешин Н. Н., Кириллов С. В.* Природа гетерогенности 30S рибосомных субчастиц *in vitro*. II. Два типа инактивации 30S субчастиц рибосом *Escherichia coli* // Молекуляр. биология.—1979.—**13**, № 4.—С. 752—759.
8. *Rheinberger H. J., Sternbach H., Nierhaus K. H.* Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—**78**, N 9.—P. 5310—5314.
9. *Grajevskaja R. A., Ivanov Yu. V., Saminsky E. M.* 70S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding // Eur. J. Biochem.—1982.—**128**, N 1.—P. 47—52.
10. *Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P.* Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.—1983.—**157**, N 1.—P. 91—94.
11. *Binding of complementary oligonucleotides to aminoacylated tRNA^{Phe} from yeast* // O. Pongs, P. Wrede, V. A. Erdmann, M. Sprinzi // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1976.—**71**, N 4.—P. 1025—1033.

Отдел генетики растений АН МССР, Кишинев
Ленинград, ин-т ядерной физики
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 9.04.85

УДК 577.217.337

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ НЕАКТИВНЫХ КОНФОРМЕРОВ тРНК С ЛЕЙЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗОЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Появление биологически неактивных форм тРНК наблюдается при некоторых состояниях организма животных, сопровождающихся изменением биосинтеза белков [1—3]. Ранее нами показано, что значения термодинамических параметров конформационного перехода при ренатурации *in vitro* сходны для неактивных конформеров тРНК, вы-